

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：94404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06374

研究課題名(和文) 植食性昆虫が進化に至る、最初の変化は何か

研究課題名(英文) What is a first change of phytophagous insects leading to evolution.

研究代表者

尾崎 克久 (Ozaki, Katsuhisa)

株式会社生命誌研究館・その他部局等・研究員

研究者番号：60396223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：味覚受容体と産卵行動には密接な関係があることが知られている。クロアゲハとミヤマカラスアゲハのメス成虫前脚で働いている遺伝子を網羅的に調べた結果、この2種間でよく似ている味覚受容体遺伝子を発見した。2種が共通に認識する化合物としてフェラムリンが知られており、重要なフェラムリン受容体候補であると考えた。

味覚神経がどの化合物に反応するか調べる電気生理実験により、両種ともにフェラムリンに反応を示すことが確認できた。受容体候補遺伝子の働きを阻害し、フェラムリンに対する反応能が低下するか確認する実験を試みたが、飼育個体数を十分に確保することができなかつたため結論を得るには至らなかつた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アゲハチョウの仲間、食草を変更したことをきっかけに種の多様化が起きたと考えられている。食べられる植物の種類を増やす広食化ではなく、狭食性のまま食草を変更することで命を紡いできたのは、どのような仕組みに支えられていたのだろうか。我々は、元々食べていた食草を嫌いになるという変化が起きることが、食草転換の最初の一步になったのではないかと考えた。

クロアゲハはミカン科キハダを嫌い、ミヤマカラスアゲハはキハダを好むが、どちらの種にとってもその原因物質はフェラムリンである。種の違いを生む原因となった遺伝子を解明する事ができれば、昆虫と植物がどのように関わり合いながら「生きている」のかを理解できる。

研究成果の概要(英文)：It is known that gustatory receptors and oviposition behavior are closely related. Transcriptome analysis using adult female fore-legs of *Papilio protenor* and *P. maackii* revealed a highly conserved gustatory receptor gene between the two species. Phellamurin is known as a compound commonly recognized by the two species, and it was considered an important receptor candidate.

Electrophysiological experiments using the chip recording method confirmed that chemo-sensilla on female tarsi of both species responded to phellamurin. Therefore, we try to confirm whether the function response to phellamurin of receptor candidate genes of both species is inhibited or not by RNAi. However, no conclusion was reached because a sufficient number of breeding individuals could not be secured.

研究分野：分子生物学

キーワード：アゲハチョウ クロアゲハ ミヤマカラスアゲハ 味覚受容体 産卵行動 食草選択 種分化 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミカン科植物キハダは、ミヤマカラスアゲハの主要な食草であるが、クロアゲハのメス成虫は産卵しない。その原因物質はフェラムリンで、ミヤマカラスアゲハにとっては産卵刺激物質であるのに対し、クロアゲハにとっては0.2%とごくわずかに含まれているだけでも産卵しなくなる強力な忌避物質である。しかし、人為的にクロアゲハの幼虫にキハダを与えると、何の問題もなく育つことが知られている。

2. 研究の目的

クロアゲハとミヤマカラスアゲハは同じフェラムリン受容体を持っており、クロアゲハは忌避行動に關与する神経細胞で、ミヤマカラスアゲハは産卵行動に關与する神経細胞で発現することでキハダに対する「好み」の違いが生じているのではないかと考えた。

クロアゲハで産卵行動に關わる「忌避神経」というものが存在することを解明し、クロアゲハとミヤマカラスアゲハで共通するフェラムリン受容体とその忌避神経で発現していることを確認できれば、食草転換の最初の一步となった「好みの変化」を分子生物学的に解明できる。

3. 研究の方法

はじめに、トランスクリプトーム解析によって、2種で共通するフェラムリン受容体遺伝子を探索する。クロアゲハのフェラムリン受容体遺伝子の発現をRNAiによって阻害し、電気生理実験でフェラムリンに対する応答が低下するか確認する。また、RNAiによってフェラムリン受容体遺伝子の発現が阻害されたクロアゲハメス成虫が、キハダに産卵するようになるか否かを観察することで、忌避行動の仕組みを解明する。

4. 研究成果

ミヤマカラスアゲハは山間部に生息している蝶であるため、採集には大きな労力を要した。メス成虫に食草の一つであるカラスザンショウの生葉および乾燥粉末を水で溶いた溶液を与えた結果、産卵しなかった。同様の方法でクロアゲハは産卵した。ミヤマカラスアゲハの主たる食草であるキハダの生葉を入手して与えた結果、産卵を確認できた。

研究代表者はこれまでに、人工飼料によるアゲハチョウの飼育プロトコールを開発しており、多くの種類のアゲハチョウを飼育した経験があるので、同じ手法でミヤマカラスアゲハ幼虫の飼育を試みた。その結果、初齡幼虫の人工飼料への食いつきが悪く、多くの個体が二齡に到達できずに死んでしまった。ミヤマカラスアゲハに限っては、他の種と比較して食草粉末の割合を半分程度に減らして「薄味」にする必要があった。二齡に到達できた個体は順調に生育し、成虫を得ることができた。

Illumina TruSeq RNA kit を用いてミヤマカラスアゲハのメス成虫前脚のシーケンスライブラリーを作成し、Illumina MiSeq 600 cycle kit で塩基配列決定した結果、29個の化学感覚受容体候補遺伝子が見つかった。そのうち、完全長と推測されるものが5個あった。

クロアゲハのトランスクリプトームデータを対象としてBLASTPを用いたホモロジー検索を行なった結果、部分配列ではあるもののクロアゲハの味覚受容体候補と高い相同性を示す配列が見つかった。両種に保存されている味覚受容体であれば、フェラムリン受容体である可能性が示唆される。

発見した味覚受容体遺伝子の機能を明らかにするため、メス成虫前脚ふ節の化学感覚子に電極で刺激を行うチップレコーディング法による電気生理実験に取り組んだ。ミヤマカラスアゲハは産卵刺激物質が未解明であるのに対し、クロアゲハは生の葉と同等の産卵行動が観察される植物化合物が解明されているので、クロアゲハを用いて産卵刺激物質に対する応答を調べた。

我々が既に産卵に関わる味覚神経の働きを明らかにしているナミアゲハの場合(Ryuda et al, 2013)と同様に、各化合物に対応する三種類の味覚神経細胞が応答していることが確認された。ミヤマカラスアゲハに対しては産卵刺激物質、クロアゲハに対しては忌避物質として作用するフェラムリンで刺激をおこなった場合も、両種の前脚で神経細胞の応答が観察された。

候補となる受容体遺伝子の RNAi による機能阻害を行い、電気生理実験と産卵行動実験により機能解析を行う予定であったが、飼育によって必要な個体数を確保することができなかったため結論を得るには至らなかった。

電気生理実験と産卵行動実験は困難であったため、得られた少数の個体からゲノム DNA 抽出を行い、次世代型シーケンサーを用いたゲノム解読を試みた。Illumina 社製シーケンサーのショートリードと Oxford Nanopore 社製シーケンサーのロングリードを合わせたハイブリッドアセンブリーに取り組んだ。Nanopore 社製の試薬キット類の納品が大幅に遅れたため、Illumina 社製シーケンサーのショートリードのみを用いたアセンブリーを先行して行った。N50 が約 70Kbp とショートリードのみの結果としては良好であったが、プロモーター等の発現制御に関わる領域の解析には不十分な長さであった。Nanopore 社製シーケンサーを用いたロングリードの追加は予定より遅れたが、平均長 120Kbp の良好な結果が得られた。このリードを用いてハイブリッドアセンブリーに取り組んでいる。

研究に必要な分のデータは取得済みなので、これらを用いた解析結果を合わせ、期間終了後ではあるが論文として投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎克久・宇賀神篤・龍田勝輔・吉川寛
2. 発表標題 アゲハチョウの食草が変わった時、最初に何が起きているのだろうか？
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎 克久, 宇賀神 篤, 小寺 正明, 吉川 寛
2. 発表標題 アゲハチョウ食草転換による種分化の最初の一步は何か？
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎 克久, 宇賀神 篤, 龍田 勝輔, 吉川寛
2. 発表標題 アゲハチョウが食草を嫌いになるってどういうしくみ？
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎 克久
2. 発表標題 アゲハチョウの植物に対する好き嫌いに関わる遺伝子
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

チヨウが食草を見分けるしくみを探る
<https://www.brh.co.jp/research/lab01/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小寺 正明 (Kotera Masa-aki) (90643669)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------